

Aus dem wissenschaftlichen Laboratorium der Chirurgischen
Universitätsklinik München

Leiter: Professor Dr. Dr. E. Werle

Direktor: Professor Dr. E. K. Frey

**Zur Kenntnis der Substanz Z,
eines darm- und uterus-erregenden Polypeptides
aus menschlichem Urin**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt

von

GEORG BREHMER

aus

München



München 1958

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München.

Referent: Professor Dr. Dr. Werle

Dekan: Professor Dr. Büngeler

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 2. 1958

Herrn Professor Dr. Dr. Werle danke ich ergebenst für die Themastellung
und die Möglichkeit, in seinem Institut zu arbeiten und zu lernen.

INHALT

Einleitung	5
I. Polypeptide mit Wirkung auf die glatte Muskulatur	6
Bisherige Untersuchungen über blutdruck-, darm- und uterusaktive Polypeptide aus Urin.	11
a) Substanz Z	11
b) „Slow contracting substance“	13
c) Walaszkis Untersuchungen	15
d) Substanz U	17
II. Eigene Untersuchungen	18
a) Methoden	18
b) Ergebnisse	20
III. Diskussion	28
Zusammenfassung	29
Literatur	30



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555221_0111

Einleitung

In den letzten Jahrzehnten ist eine größere Zahl im tierischen Organismus vorkommender Polypeptide aufgefunden und untersucht worden. Das große Interesse, das man diesen Stoffen entgegenbringt, gründet sich einerseits auf ihre physiologische bzw. pharmakologische Bedeutung, wie sie z. B. beim Insulin oder bei den Hormonen des Hypophysenhinterlappens im Vordergrund steht. Zum anderen bietet die Tatsache, daß die physiologisch vorkommenden Polypeptide als Bruchstücke von Eiweißkörpern aufzufassen sind, einen verständlichen Anreiz, sich intensiv mit ihnen zu befassen. Man darf hoffen, durch eine genaue Kenntnis des Aufbaues der Polypeptide auch einen Zugang zu finden zu der wichtigen, aber bisher so schwer anzugehenden Klasse spezifisch wirksamer Eiweißstoffe.

Es ist bekannt, daß in der letzten Zeit hier entscheidende Fortschritte erzielt worden sind. So gelang es S a n g e r, die Struktur des Insulins aufzuklären, und V i g n e a u d konnte die Hypophysenhinterlappenhormone Oxytocin und Vasopressin nicht nur analysieren, sondern auch synthetisieren. Hypertensin wurde durch P e a r t in seiner Konstitution aufgeklärt und kürzlich in den wissenschaftlichen Laboratorien der „Ciba“ Basel synthetisiert.

Das sind freilich — zum mindesten was die tierischen Polypeptide betrifft — Ausnahmen. Die meisten dieser Stoffe liegen bis jetzt in nur mäßig angereicherter Form vor, so daß dem Versuch einer Konstitutionsermittlung vorläufig unübersteigbare Hindernisse entgegenstehen. Dagegen besitzen wir über sonstige chemische, sowie physiologische und pharmakologische Eigenschaften heute schon mancherlei Kenntnisse.

In der vorliegenden Arbeit interessiert eine Gruppe von im menschlichen und tierischen Organismus vorkommenden Polypeptiden, deren hervorstechende Eigenschaft eine Wirkung auf die glatte Muskulatur ist. Speziell haben wir uns mit einem blutdruck-, darm- und uterusaktiven Prinzip aus menschlichem Urin befaßt, das von W e r l e und E r d ö s 1954 beschrieben und als „Substanz Z“ bezeichnet worden war. Wir bemühten uns, Substanz Z weiter zu reinigen, und pharmakologisch, chemisch und physikalisch näher zu charakterisieren. Eine von G o m e s 1955 beschriebene „slow contracting substance“, ebenfalls ein Polypeptid aus menschlichem Urin mit gleichartigen Eigenschaften, sollte jeweils zu Vergleichsuntersuchungen herangezogen werden.

I. Polypeptide mit Wirkung auf die glatte Muskulatur

Substanzen von Polypeptidcharakter, die glattemuskelige Organe pharmakologisch beeinflussen, kommen zum Teil in Geweben und Ausscheidungen natürlich vor. Andere entstehen erst unter der Einwirkung von Fermenten oder fermentartigen Stoffen auf Eiweiße aus tierischen Geweben, unter denen vor allem gewisse Serumglobuline (α_2 -Globulinfraktion) eine Rolle spielen. Die Tabellen 1 und 2 geben einen Überblick über eine Reihe solcher Polypeptide und ihren Ursprungsort bzw. ihre Entstehungsweise.

Tabelle 1:

Aus Geweben und Ausscheidungen gewonnene Polypeptide.

Polypeptid	Vorkommen	Bemerkungen
Oxytocin, Vasopressin (1)	Neurohypophyse Zwischenhirn	relativ einfach gebaute Oktapeptide, die sich durch 2 Aminosäuren unterscheiden
Kallikrein (2,3)	Speicheldrüsen einschl. Pankreas, Blutserum, Urin	hochmolekular, nicht dialysabel. Mol.-Gew. um 48 000. Kallikreine aus verschiedenen Organen nicht identisch.
Substanz P (4)	Darm, Nervengewebe einschl. Zentralnerven- system	dialysierbar, vorwiegend hydrophil, thermostabil
Darmstoff (5)	Darm	dialysierbar, Eigenschaf- ten einer Säure. In Chlo- roform löslich
Substanz U (s. auch Tab. 2)	durch Ureterenkatheter gewonnener Urin von Hunden	Einzelheiten werden weiter unten besprochen
Substanz Z	Urin von Menschen und verschied. Tieren	Einzelheiten werden weiter unten besprochen
„Slow contracting substance“ von G o m e s	menschl. Urin	Einzelheiten werden weiter unten besprochen

Tabelle 2:

Durch Einwirkung fermentartiger Stoffe auf körpereigene Eiweiße entstandene Polypeptide.

Polypeptid	gebildet aus	gebildet durch	Bemerkungen
Kallidin (2,3)	Kallidinogen in Serumglobulin (α_2 -Fraktion)	Kallikrein oder Trypsin	langsam dialysierbar; pharmakologisch, chemisch und physikalisch nicht zu unterscheiden
Bradykinin (6)	Bradykininogen in Serumglobulin (α_2 -Fraktion)	proteolyt. Fermente in Schlangengift	
andere „Slow contracting substances“ (7, 8, 9, 10)	Serum	verschiedene proteolyt. Fermente, z. B. aus Bakterien	
Substanz U (11)	nur Hundeserum	nicht dialysierbare Urinfraction des Hundes	dialysierbar, sehr ähnlich den obigen, aber nicht identisch
Pepsitensin, Pepsitocin Pepsanurin (12)	entspr. „-ogene“ im Serum (vorw. α_2 -Globuline)	Pepsin	sehr ähnlich den entspr. Hypophysenhinterlappenhormonen
Hypertensin (Angiotonin) (13, 14)	Hypertensinogen im Serum (α_2 -Globuline)	Renin	in physikalisch-chemischer Hinsicht Ähnlichkeit mit den obigen Substanzen

Trotz aller nachweisbaren Verschiedenheit zeigen diese Stoffe sowohl in ihrem chemisch-physikalischen Verhalten wie auch in pharmakologischer Hinsicht überraschende Übereinstimmungen, die häufig geradezu gesetzmäßig gekoppelt erscheinen, allerdings gelegentlich auch in vorläufig noch ganz undurchsichtiger Weise auseinander fallen können. Besonders G a d d u m [15] hat auf Zusammenhänge zwischen den einzelnen Substanzen hingewiesen und darauf eine Einteilung in 6 Gruppen gegründet (Tabelle 3).

Tabelle 3:

Polypeptide nach Wirkung und chemischem Verhalten
zu Gruppen geordnet (nach G a d d u m).

Polypeptid	Blutdruck- wirkung	Andere Wirkungen	inaktiviert durch		
			Chymo- trypsin	Trypsin	Pepsin
1. Vasopressin	Steigerung	antidiuretisch	+	+	0
Pepsanurin	0	antidiuretisch	+	+	0
2. Oxytocin	Senkung	Uterus- kontraktion	+	0	0
Pepsitocin	0	Uterus- kontraktion	+	0	0
3. Cholecysto- kinin		Gallenblasen- kontraktion			
4. Substanz P	Senkung	Darm- kontraktion	+	+	+
5. Kallidin	Senkung	Uterus- u. Darm- kontraktion	+	0	
Bradykinin	Senkung	Uterus- u. Darm- kontraktion	+	0	
Substanz U	Senkung	Uterus- u. Darm- kontraktion	+	0	
Substanz Z	Senkung	Uterus- u. Darm- kontraktion	+	0	0 ¹⁾
6. Hypertensin	Steigerung		+	+	+
Pepsitensin	Steigerung		+	+	+

¹⁾ Die Angabe bezieht sich offenbar auf G o m e s' „slow contracting substance“ aus Urin.

Fast allen Substanzen gemeinsam sind nach G a d d u m folgende Eigenschaften: Sie sind durch Chymotrypsin angreifbar. Sie sind bei 100° C relativ stabil in mäßig saurer Lösung, instabil dagegen in stark saurem oder alkalischem Milieu. Bei hochgradiger Reinigung nimmt die Stabilität ab. Sie sind löslich in Wasser, Eisessig und Phenol, unlöslich in Äther und Petroläther. In Aceton oder Äthanol lassen sie sich nur in Anwesenheit einer gewissen Menge Wasser lösen. Die

für die einzelnen Substanzen angegebenen Löslichkeitsunterschiede sind nach der Ansicht von G a d d u m mehr quantitativer, als qualitativer Art. Sie müßten ihre Ursache nicht unbedingt in einer Verschiedenheit der Substanzen haben, könnten vielmehr ebensogut durch mehr oder weniger starke Verunreinigung entstanden sein.

Von G a d d u m stammt auch die Feststellung, daß die Pressor-substanzen unter den angeführten Polypeptiden grundsätzlich durch Trypsin zerstört werden, während die depressorisch wirksamen Stoffe diesem Ferment gegenüber resistent zu sein scheinen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß hier eine regelmäßige Beziehung zwischen Struktur und Wirkung ihren Ausdruck findet. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß sich das unterschiedliche Verhalten der Hypophysenhinterlappenhormone gegenüber Trypsin mit den heutigen Kenntnissen der Fermentchemie [16] bereits einleuchtend interpretieren läßt. Man weiß aus Untersuchungen an synthetischen Polypeptiden, daß Trypsin grundsätzlich nur Peptidbindungen angreift, an denen eine basische Aminosäure beteiligt ist. Beim Vasopressin ist diese Voraussetzung zwischen der Carboxylgruppe von Arginin (bzw. Lysin) und der Aminogruppe des endständigen Glycinamids gegeben, bei Oxytocin fehlt sie.

Es ist nicht immer leicht zu entscheiden, ob zwei gleichartig wirkende Polypeptide identisch oder verschieden sind. Ein instruktives Beispiel für die zweite Möglichkeit bieten Rinder- und Schweinevasopressin, die sich in ihrer Wirkung nicht voneinander abgrenzen lassen, chemisch dagegen sich in der 7ständigen Aminosäure (Arginin bei Rinder-, Lysin bei Schweinevasopressin) unterscheiden. Umgekehrt ist es nicht auszuschließen, daß pharmakologisch verschiedenartig wirkende Polypeptide in einem Teil ihrer Kette gleich gebaut sind. Bis zu einem gewissen Grade ist dies der Fall bei den Hinterlappenhormonen Vasopressin und Oxytocin, die trotz verschiedenartiger, z. T. geradezu gegensätzlicher Wirkungen, in ihrer Grundstruktur überraschende Ähnlichkeit erkennen lassen. Eine Identität über längere Strecken wäre denkbar, wenn die mehrfach geäußerte Hypothese (Näheres s. bei 17) zutreffen sollte, daß u. U. der gleiche Bluteiweißkörper durch verschiedene Fermente an unterschiedlichen Stellen in pharmakologisch aktive Polypeptide gespalten werden kann.

Fern von solchen noch recht hypothetischen Überlegungen haben G a d d u m u. a. sich um praktische Möglichkeiten bemüht, Substanzen, die auf verschiedene Organe in qualitativ gleicher Weise einwirken, durch quantitative Beobachtung und sinnreiche Auswertung der Ergebnisse sicher gegeneinander abzugrenzen. Ausführliche Einzelheiten zur Methodik finden sich bei G a d d u m [15].

Über die Wirkungsweise der Polypeptide an der glatten Muskulatur ist bisher wenig bekannt. Gewisse chemische Gruppen scheinen

für die Aktivität erforderlich zu sein. Man weiß, daß die Hypophysenhinterlappenhormone ihre Wirksamkeit verlieren, wenn die Cystinbindung in ihrem Molekül durch Reduktionsmittel gesprengt wird. Umgekehrt ist die Gefäßwirkung des hochmolekularen Polypeptids Ferritin an die Unversehrtheit von SH-Gruppen gebunden. G o m e s hat festgestellt, daß seine „slow contracting substance“ im Gegensatz zu Oxytocin durch Thiosorbitol nicht inaktiviert wird. Allerdings sagt eine solche Feststellung an einer noch nicht sehr reinen Substanz nichts Endgültiges aus. So sind z. B. Oxytocin und Vasopressin, solange sie an den v a n D y k e s c h e n Eiweißkörper gebunden sind, gegen eine Reduktion durch Cystein geschützt [18].

Auch die Unversehrtheit von NH_2 -Gruppen scheint von Bedeutung zu sein. Entsprechende Hinweise finden sich u. a. für Kallikrein, Kallidin und Substanz Z. Schließlich ist die Wirkung von Vasopressin, Oxytocin, Kallikrein und Kallidin [19] von einer intakten Tyrosingruppe abhängig.

Man weiß von verschiedenen Polypeptiden, daß ihre Wirksamkeit, bezogen auf die nachgewiesene oder vermutete Molarität, außerordentlich hoch ist. 1 γ Oxytocin oder Vasopressin, d. h. ca. $10^{-3} \mu \text{ Mol}$, haben eine Aktivität von 0,5 bis 0,6 Einheiten. Von dem hochmolekularen Kallikrein erzeugen noch 0,02 γ eines gereinigten Präparates pro kg Körpergewicht beim Hund eine deutliche Blutdrucksenkung [3]. R o c h a e S i l v a [6] kommt für Bradykinin ebenfalls zu erstaunlichen Werten. Nach seinen Berechnungen genügen 0,015 mg Bradykinin pro ml Badflüssigkeit zu einer starken Darmkontraktion. Nimmt man das Molekulargewicht von Bradykinin als 40 bis 50 mal größer an, als das von Histamin, so ergibt sich, daß niedermolekulare Substanzen wie Histamin oder Acetylcholin durch Bradykinin an Aktivität weit übertroffen werden.

Fast nichts ist bekannt über Aktivierung bzw. Potenzierung der Wirkung von Polypeptiden durch andere pharmakologisch aktive Substanzen. Lediglich P a g e [14] berichtet über eine Steigerung der Angiotoninwirkung auf ungefähr das Dreifache durch vorherige Gaben von Tetraaethylammoniumchlorid, W e r l e und G r u n z über eine Steigerung der Wirkung von Kallidin durch gleichzeitige Gabe von Cystein, welches die Inaktivierung des Kallidins durch Serum hemmt. Eine eigene einschlägige Beobachtung wird unten mitgeteilt (s. S. 27).

Noch nicht zu beantworten ist für manche unserer Polypeptide die Frage, ob ihnen physiologische Bedeutung zukommt. Einige der Substanzen scheinen unter pathologischen Bedingungen eine Rolle zu spielen.

Bisherige Untersuchungen über blutdruck-, darm- und uterusaktive Polypeptide aus Urin

a) Substanz Z von Werle und Erdös

Werle und Erdös [20] haben 1954 aus menschlichem Urin ein pharmakologisch aktives Prinzip isoliert, das sie als „Substanz Z“ bezeichnen. Eine Reihe von Befunden spricht dafür, daß es sich um ein Polypeptid handelt.

1. Pharmakologisches Verhalten

Im Vordergrund steht eine Wirkung auf Organe mit glatter Muskulatur. Substanz Z erzeugt am isolierten Meerschweinchendarm eine langsam einsetzende und lang anhaltende Kontraktion. Eine 5–20 ml Urin entsprechende Menge genügt zur Auslösung dieses Phänomens. Gleichartige Wirkung wurde auch am Darmpräparat von Kaninchen, Hund, Katze und Schwein nachgewiesen. Wichtig für die Abgrenzung gegenüber anderen pharmakologisch wirksamen Stoffen ist die Tatsache, daß Substanz Z auf das isolierte Rattencolon praktisch ohne Einfluß ist.

Auch der isolierte Uterus wird von Substanz Z zu einer lang anhaltenden, trägen Kontraktion angeregt. Als geeignetes Testobjekt erwies sich der isolierte Rattenuterus im Oestrus und Dioestrus. Hier genügte die 5–10 ml Urin entsprechende Menge zur Erzeugung einer submaximalen Kontraktion. Auch Streifen aus Schafuterus und virginellem Kaninchenuterus sind empfindlich gegenüber Substanz Z. Schweine- und Hundureter sprechen ebenfalls auf Substanz Z an.

Der Blutdruck wird durch Substanz Z bei intravenöser Verabreichung vorübergehend gesenkt. Die erforderlichen Dosen sind allerdings wesentlich höher. Die 5 ml Urin entsprechende Menge pro 100 g Körpergewicht erzeugte bei der Ratte eine Blutdrucksenkung von 20 bis 40 mm Hg. Nachgewiesen wurde die Blutdrucksenkung außerdem an narkotisierten Hunden, Katzen und Kaninchen.

Neben dem Einfluß auf glattemuskelige Organe wurde eine anti-diuretische Wirkung der Substanz Z bei Ratten festgestellt.

2. Isolierung

Die von Werle und Erdös angegebene Anreicherung, die weiter unten ausführlich wiedergegeben wird, gründet sich im wesentlichen auf folgende Reinigungsschritte: Fällung des wirksamen Prinzips mit Zinkferrocyanid, Elution mit ammoniakalischer 80%iger Äthanollösung, Ausfällung störender Begleitstoffe mit Bleiacetat, Alkalisierung der Restlösung und 6stündige Dialyse gegen fließendes

für die Aktivität erforderlich zu sein. Man weiß, daß die Hypophysenhinterlappenhormone ihre Wirksamkeit verlieren, wenn die Cystinbindung in ihrem Molekül durch Reduktionsmittel gesprengt wird. Umgekehrt ist die Gefäßwirkung des hochmolekularen Polypeptids Ferritin an die Unversehrtheit von SH-Gruppen gebunden. G o m e s hat festgestellt, daß seine „slow contracting substance“ im Gegensatz zu Oxytocin durch Thiosorbitol nicht inaktiviert wird. Allerdings sagt eine solche Feststellung an einer noch nicht sehr reinen Substanz nichts Endgültiges aus. So sind z. B. Oxytocin und Vasopressin, solange sie an den v a n D y k e schen Eiweißkörper gebunden sind, gegen eine Reduktion durch Cystein geschützt [18].

Auch die Unversehrtheit von NH_2 -Gruppen scheint von Bedeutung zu sein. Entsprechende Hinweise finden sich u. a. für Kallikrein, Kallidin und Substanz Z. Schließlich ist die Wirkung von Vasopressin, Oxytocin, Kallikrein und Kallidin [19] von einer intakten Tyrosingruppe abhängig.

Man weiß von verschiedenen Polypeptiden, daß ihre Wirksamkeit, bezogen auf die nachgewiesene oder vermutete Molarität, außerordentlich hoch ist. 1 γ Oxytocin oder Vasopressin, d. h. ca. $10^{-3} \mu \text{ Mol}$, haben eine Aktivität von 0,5 bis 0,6 Einheiten. Von dem hochmolekularen Kallikrein erzeugen noch 0,02 γ eines gereinigten Präparates pro kg Körpergewicht beim Hund eine deutliche Blutdrucksenkung [3]. R o c h a e S i l v a [6] kommt für Bradykinin ebenfalls zu erstaunlichen Werten. Nach seinen Berechnungen genügen 0,015 mg Bradykinin pro ml Badflüssigkeit zu einer starken Darmkontraktion. Nimmt man das Molekulargewicht von Bradykinin als 40 bis 50 mal größer an, als das von Histamin, so ergibt sich, daß niedermolekulare Substanzen wie Histamin oder Acetylcholin durch Bradykinin an Aktivität weit übertroffen werden.

Fast nichts ist bekannt über Aktivierung bzw. Potenzierung der Wirkung von Polypeptiden durch andere pharmakologisch aktive Substanzen. Lediglich P a g e [14] berichtet über eine Steigerung der Angiotoninwirkung auf ungefähr das Dreifache durch vorherige Gaben von Tetraäthylammoniumchlorid, W e r l e und G r u n z über eine Steigerung der Wirkung von Kallidin durch gleichzeitige Gabe von Cystein, welches die Inaktivierung des Kallidins durch Serum hemmt. Eine eigene einschlägige Beobachtung wird unten mitgeteilt (s. S. 27).

Noch nicht zu beantworten ist für manche unserer Polypeptide die Frage, ob ihnen physiologische Bedeutung zukommt. Einige der Substanzen scheinen unter pathologischen Bedingungen eine Rolle zu spielen.

Bisherige Untersuchungen über blutdruck-, darm- und uterusaktive Polypeptide aus Urin

a) Substanz Z von Werle und Erdös

Werle und Erdös [20] haben 1954 aus menschlichem Urin ein pharmakologisch aktives Prinzip isoliert, das sie als „Substanz Z“ bezeichnen. Eine Reihe von Befunden spricht dafür, daß es sich um ein Polypeptid handelt.

1. Pharmakologisches Verhalten

Im Vordergrund steht eine Wirkung auf Organe mit glatter Muskulatur. Substanz Z erzeugt am isolierten Meerschweinchendarm eine langsam einsetzende und lang anhaltende Kontraktion. Eine 5—20 ml Urin entsprechende Menge genügt zur Auslösung dieses Phänomens. Gleichartige Wirkung wurde auch am Darmpräparat von Kaninchen, Hund, Katze und Schwein nachgewiesen. Wichtig für die Abgrenzung gegenüber anderen pharmakologisch wirksamen Stoffen ist die Tatsache, daß Substanz Z auf das isolierte Rattencolon praktisch ohne Einfluß ist.

Auch der isolierte Uterus wird von Substanz Z zu einer lang anhaltenden, trägen Kontraktion angeregt. Als geeignetes Testobjekt erwies sich der isolierte Rattenuterus im Oestrus und Dioestrus. Hier genügte die 5–10 ml Urin entsprechende Menge zur Erzeugung einer submaximalen Kontraktion. Auch Streifen aus Schafsuterus und virginellem Kaninchenuterus sind empfindlich gegenüber Substanz Z. Schweine- und Hundeureter sprechen ebenfalls auf Substanz Z an.

Der Blutdruck wird durch Substanz Z bei intravenöser Verabreichung vorübergehend gesenkt. Die erforderlichen Dosen sind allerdings wesentlich höher. Die 5 ml Urin entsprechende Menge pro 100 g Körpergewicht erzeugte bei der Ratte eine Blutdrucksenkung von 20 bis 40 mm Hg. Nachgewiesen wurde die Blutdrucksenkung außerdem an narkotisierten Hunden, Katzen und Kaninchen.

Neben dem Einfluß auf glattemuskelige Organe wurde eine anti-diuretische Wirkung der Substanz Z bei Ratten festgestellt.

2. Isolierung

Die von Werle und Erdös angegebene Anreicherung, die weiter unten ausführlich wiedergegeben wird, gründet sich im wesentlichen auf folgende Reinigungsschritte: Fällung des wirksamen Prinzips mit Zinkferrocyanid, Elution mit ammoniakalischer 80%iger Äthanollösung, Ausfällung störender Begleitstoffe mit Bleiacetat, Alkalisierung der Restlösung und 6stündige Dialyse gegen fließendes

Wasser, Fällung der Substanz Z mit Natriumtetraphenylborat (Kallignost), Entfernung störender Substanzen durch Aufnehmen in Methanol.

Die in einem Liter Urin enthaltene Substanz Z befindet sich zum Schluß in 1 ml wässriger Lösung, die im günstigsten beobachteten Fall noch 1,2 mg organischer Substanz enthielt.

3. Physikalische und chemische Eigenschaften

Substanz Z ist löslich in Wasser, 90 % Athanol und 96 % Methanol, unlöslich in Aceton, Äther und Toluol. Bei der Dialyse gegen fließendes Wasser (Cellophan Nr. 400) ist sie nach 48 Stunden nicht mehr nachweisbar, wogegen nach 6 Stunden (in alkalischem Milieu) kein wesentlicher Aktivitätsverlust festzustellen ist. Durch Natriumtetraphenylborat und durch Pikrinsäure wird Substanz Z gefällt, nicht dagegen durch Pikrolon- und Flaviansäure. Substanz Z kann bei neutraler Reaktion 60 Minuten, bei p_H 0 15 Minuten lang bei 100° C gehalten werden, ohne an Wirkung zu verlieren. Durch Kochen in n-NaOH wird sie innerhalb von 15 Minuten zerstört. Bei Zimmertemperatur ist Substanz Z gegenüber n-NaOH 3 Stunden lang beständig. Durch salpetrige Säure wird sie inaktiviert. Von kristallisiertem Trypsin wird Substanz Z nicht angegriffen; durch Chymotrypsin und Dymal wird sie vollständig zerstört, ebenso durch Blutserum, hämolytierte Erythrozyten und Galle.

4. Abgrenzung gegen Stoffe mit ähnlicher pharmakologischer Wirkung

Die pharmakologischen sowie die chemischen und physikalischen Unterschiede der in Frage kommenden Substanzen gegenüber Substanz Z sind in Tabelle 4 (s. S. 13) aufgeführt.

Die hochmolekularen Polypeptide Kallikrein und Depressan, niedermolekulare Stoffe wie Acetylcholin, Histamin, 5-Oxytryptamin, Adenosin, sowie die Hormone des Hypophysenhinterlappens zeigen so eindeutige pharmakologische oder chemisch-physikalische Unterschiede gegenüber Substanz Z, daß hier auf die Wiedergabe von Einzelheiten verzichtet werden kann. Im Verlauf des Darstellungsprozesses werden sie mit Sicherheit abgetrennt oder zerstört.

Tabelle 4:

Unterschiede zwischen Substanz Z und pharmakologisch ähnlichen Substanzen.

Polypeptid	pharmakolog. Unterschiede	chemische und physikalische Unterschiede
Bradykinin	Wirkung auf das Rattencolon	weitgehendes Verschwinden nach 1stündigem Stehen in 2n-NaOH bei 20° und anschließendem 6stündigem Dialysieren
Kallidin	Wirkung auf das Rattencolon	
Substanz U		
Darmstoff	keine Blutdrucksenkung, Wirkung auf das Rattencolon	lipoidlöslich
Substanz P	Wirkung auf das Rattencolon, unwirksam am Rattenuterus	Empfindlichkeit gegenüber Säuren und Trypsin, Unempfindlichkeit gegenüber Serum und salpetriger Säure.

¹⁾ In neueren Berichten [11] hat Beraldo diese Befunde korrigiert. Substanz U ist relativ thermostabil. Sie verträgt 30 Minuten langes Kochen in 0,5 n-HCl. Durch Inkubation mit Hunde- oder Menschenserum wird Substanz U inaktiviert.

b) Gomes' „langsam-kontrahierende“ Substanz aus menschlichem Urin

Angeregt durch die Beobachtung Gaddums, daß der überströmte Rattenuterus eine erhebliche Empfindlichkeit gegenüber verdünntem menschlichem Urin zeigt, isolierte Gomes [21] unabhängig von Werle und Erdös eine „slow contracting substance“ aus normalem menschlichen Urin. Sie ist in pharmakologischer, chemischer und physikalischer Beziehung der Substanz Z so ähnlich, daß Gomes eine Identität beider Substanzen in Erwägung zieht.

1. Pharmakologisches Verhalten

Die „slow contracting substance“ (S. c. s.) kontrahiert den überströmten Rattenuterus [22] nach einer kennzeichnenden Latenzzeit von durchschnittlich 20 bis 40 Sekunden. Schwächere, aber eindeutige kontrahierende Wirkung findet sich am Meerschweinchenileum. Am rec-talen Coecum des Huhns wurde keine Kontraktion erhalten — im Gegensatz zu Bradykinin. Nicht ganz einheitliche Ergebnisse wurden am Blutdruck der Katze und des Kaninchens erzielt. Wenn sich ein Einfluß zeigte, so handelte es sich stets um eine Blutdrucksenkung. Die erforderlichen Dosen waren hier verhältnismäßig hoch.

2. Isolierung

G o m e s gibt zwei Verfahren an. Bei Methode A wird das aktive Prinzip aus alkalisiertem Urin (pH 9) an Charcoal adsorbiert und mit Eisessig eluiert. Auf Zugabe von Äther fällt die Substanz aus. Sie wird durch Aufnehmen in 80% Äthanol weiter gereinigt und im Vakuum zur Trockne gebracht. Die Ausbeute überschreitet nicht 30% der ursprünglichen Aktivität. Methode B wurde in Anlehnung an Clark, Winckler, Gollan und Fox [23] entwickelt. Sie ist einfacher und bringt, bezogen auf die ursprüngliche Aktivität, 100%ige Ausbeute. Angesäuerter Urin wird mit NaCl gesättigt und durch Schütteln mit n-Butanol extrahiert. Aus dem abgetrennten Butanol wird das aktive Prinzip mit Äther ausgefällt. Ein Liter Urin gibt ca. 1 g eines rötlich-weißen Pulvers. Das Präparat zeichnet sich durch erhebliche Stabilität aus.

3. Physikalische und chemische Eigenschaften

Das aktive Prinzip dialysiert langsam durch Cellophanmembranen. Wurde unter Schütteln gegen destilliertes Wasser dialysiert, so wies die Außenflüssigkeit nach 4 Stunden noch keine meßbare Aktivität auf, nach 24 Stunden war die Aktivität auf beide Seiten gleichmäßig verteilt. Die Stabilität der Substanz hängt vom pH ab. Urin und Lösungen des Extraktes verloren bei pH 7 nach 24stündigem Stehen bei Raumtemperatur 50%, bei pH 5 nur 10 bis 20%, bei pH 9 mehr als 75% der ursprünglichen Aktivität. In 0,03 n-HCl gelöstes Butanol-extrakt wurde bei 100° C nach 6 Stunden nicht beeinträchtigt. In 0,3 n-HCl gelöst, wurde es nach einer Stunde zu 50% und nach 4 Stunden zu 75% zerstört gefunden; in n-HCl betrug die Aktivitätsminderung unter sonst gleichen Bedingungen innerhalb von 30 Minuten mehr als 80%. Beim Kochen in 0,1 n-NaOH kam es nach 15 Minuten zu 50%iger und nach 30 Minuten zu völliger Zerstörung. — S. c. s. ist löslich in Wasser, Eisessig, 80% Äthanol, wässrigem Aceton (80%), Phenol,

n-Butanol und Methanol, völlig unlöslich in Äther, Chloroform, Aceton und anderen organischen Lösungsmitteln, kaum löslich in absolutem Äthanol. Von Pepsin und Trypsin wird S. c. s. nicht angegriffen, dagegen durch Chymotrypsin völlig inaktiviert.

4. Papierchromatographie

G o m e s chromatographierte nach beiden Methoden gewonnene Präparate aufsteigend, auf in 0,01 n-HCl gewaschenem Papier (Whatman No. 1). Als Lösungsmittel dienten die organische Phase eines n-Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisches (4:1:5) und mit 0,01 n-HCl gesättigtes Phenol. Die Chromatographie wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Chromatogramme wurden in Streifen geschnitten, eluiert und am überströmten Rattenuterus ausgewertet. Nach Methode A gewonnene Substanz zeigte Ninhydrin-positive Flecke, die aber mit dem aktiven Prinzip nicht in Beziehung standen. Das nach Methode B hergestellte Präparat ergab in der verwendeten Menge von 0,2 mg weder mit Ninhydrin noch mit Paulys Reagens färbbare Chromatogramme. Die R_F -Werte betrugen für beide Präparate 0,2 in Butanol-Eisessig-Wasser und 0,9 in Phenol. An Aktivität wurden bei beiden Verfahren ca. 30% wiedergefunden. Salzsäurehydrolyse des Butanolextraktes und nachfolgende Papierchromatographie führte bei Verwendung beider Lösungsmittel zu 6 Ninhydrin-positiven Flecken, die nicht näher untersucht wurden.

5. Abgrenzung gegen Stoffe mit ähnlicher pharmakologischer Wirkung

Die bereits von Werle und Erdös in diesem Zusammenhang genannten Substanzen werden von G o m e s nach ähnlichen Gesichtspunkten ausgeschlossen, so daß auf eine Wiedergabe hier verzichtet werden kann. Für eine Reihe von Substanzen (u. a. Hypophysenhinterlappenhormone, 5-Oxytryptamin, Nikotin, Harnstoff, Kalium-Ionen) wird experimentell bestätigt, daß sie an den beobachteten Wirkungen nicht beteiligt sind. Dagegen hält G o m e s es für möglich, daß S. c. s. mit Bradykinin, Kallidin, Substanz U oder Substanz Z identisch ist.

c) Die Untersuchungen Walaszeks über oxytocische Polypeptide in menschlichem Urin

Kurz vor Abschluß der vorliegenden Arbeit wurden uns Untersuchungen bekannt, die W a l a s z e k [24] in Fortführung der Arbeit von G o m e s durchgeführt hat.

1. Weitere Reinigung der S. c. s.

W a l a s z e k geht von der nach Methode B gewonnenen Substanz (crude powder) aus. Eine Reinigung dieses Rohpräparates auf das 2—3fache ließ sich erzielen durch Aufnehmen in absolutem Methanol, Abzentrifugieren und Ausfällen der Substanz aus dem Überstehenden mit Äther. Das so erhaltene Präparat war weniger beständig als das Ausgangsmaterial. Weiter wurde versucht, das Rohpräparat mittels des Kationenaustauschers IR-100H zu entsalzen. Die Abtrennung der Salze war vollständig, doch betrug die Ausbeute an wirksamer Substanz nur 20—40%.

Ein guter Reinigungseffekt mit zufriedenstellender Ausbeute wurde erzielt durch Fraktionierung an einer mit HCl vorbehandelten Aluminiumoxydsäule, wie sie P e r n o w [25] zur Reinigung von Substanz P benutzt hatte. Die günstigsten Ergebnisse wurden erzielt, wenn das Ausgangsmaterial in 80% Methanol eingebracht und mit 70% Methanol eluiert wurde. Die Ausbeute überschritt 85%.

Als günstig erwies sich auch die Verwendung einer Filterpapiersäule, wie sie A n d r a d e, D i n i z und R o c h a e S i l v a [26] für die Reinigung von Bradykinin angegeben haben. Das Papierpulver (Whatman Cellulose-Pulver) wird mit 7% Phenollösung vorbehandelt. Auch das Ausgangsmaterial wird in 7% Phenollösung eingebracht. Weitere Phenollösung entfernt ca. 90% der Verunreinigungen. Zur Elution wird zunächst 0,4% Essigsäure, anschließend 0,1 n-HCl verwendet. Die Eluate werden lyophilisiert. Bei einer Reinigung auf das 6—9fache wurden im Essigsäureeluat 30 bis 60% der eingesetzten Aktivität wiedergefunden. Weitere 15 bis 30% der Originalaktivität fanden sich im Salzsäureeluat. Die Gesamtausbeute betrug 60 bis 92%. Der Verlauf der Elution zeigt, daß Essigsäure und Salzsäure zwei verschiedene Substanzen auswaschen. W a l a s z e k bezeichnet die erste als Z₁, die letztere als Z₂.

W a l a s z e k kombinierte beide Reinigungsverfahren, indem er zunächst mit Hilfe der Filterpapiersäule die Fraktion Z₁ darstellte und die gewonnene Substanz mittels Aluminiumoxyd weiter reinigte. Es ergab sich, auf die Aktivität bezogen, eine Anreicherung auf das 35- bis 68fache.

2. Papierchromatographie

W a l a s z e k verwendete die gleiche Technik wie G o m e s. Als Lösungsmittel dienten die organische Phase von n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) und Aceton-n-Butanol-HCl (10:4:2). Zur Auswertung wurde das Papier in Streifen geschnitten, eluiert und am überströmten Rattenuterus getestet.

Rohextrakt gab nach Chromatographie in Butanol-Eisessig-Wasser 5 Ninhydrin-positive Flecke, von denen einer mit der Lage der aktiven Substanz übereinstimmte. Der R_F -Wert war 0,2. Wurden Z_1 oder Z_2 eingesetzt, so fand sich für beide Substanzen ein R_F -Wert von 0.

Wurde Rohextrakt mit Aceton-Butanol-HCl chromatographiert, so war die Aktivität entweder diffus über die ersten 5–7 cm verteilt oder sie zeigte zwei Gipfel im Bereich von 0 und 5 cm. Z_1 allein ergab eine ziemlich breite Aktivitätsbande mit einem mittleren R_F -Wert von 0,6. Z_2 allein blieb am Ausgangspunkt liegen ($R_F = 0,0$).

3. Vergleich mit Bradykinin

Wegen seiner großen pharmakologischen und chemischen Ähnlichkeit mit S. c. s. wurde Bradykinin zum Vergleich herangezogen. Bradykinin zeigte in Butanol-Eisessig-Wasser einen R_F -Wert von 0,22. Wurde es gemeinsam mit S. c. s. chromatographiert, so war die Aktivität an einer einzigen umschriebenen Stelle lokalisiert.

Wurde Bradykinin an der Filterpapiersäule wie S. c. s. behandelt, so ließ es sich ebenfalls in zwei verschiedene Komponenten zerlegen, die bei Papierchromatographie mit Aceton-Butanol-HCl mit den Substanzen Z_1 und Z_2 übereinstimmten. Unverändertes Bradykinin zeigte in diesem Lösungsmittel Aktivitätsgipfel bei $R_F = 0,0$ und $R_F = 0,6$, sowie eine (auch bei Z_1 beobachtete) weniger aktive Zone bei $R_F = 0,2$.

d) Substanz U von Beraldo

Auch Substanz U zeigt nach den neueren Ergebnissen Beraldo's [11] so große Ähnlichkeit mit Substanz Z, daß eine Identität vorläufig nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Substanz wird in mittels Ureterenkatheter gewonnenem Urin von Hunden gefunden, dagegen nicht in wesentlicher Menge im Blasenurin. Bei artefizieller Kreislaufblockade an den Hinterbeinen steigt die Ausscheidung von Substanz U auf mehr als das Doppelte an.

In der nicht dialysierbaren Fraktion von Blasenurin findet sich eine mit Alkohol fällbare, thermolabile, pharmakologisch inaktive Substanz, die mit Hundeserum oder -globulin inkubiert, rasch zu einer Freisetzung von Substanz U führt. In Kontakt mit Rinderserum oder Rinderglobulin bleibt sie wirkungslos. Substanz U ist demnach nicht identisch mit Kallidin oder Bradykinin.

Substanz U kontrahiert Ileum und Uterus von Meerschweinchen, Ratte und Kaninchen. Charakteristisch ist auch hier eine Latenzzeit und eine sehr langsame Entspannung nach Erneuerung der Badflüssig-

keit. Bei Katze und Kaninchen führt Substanz U zu Blutdrucksenkung. Substanz U ist dialysierbar. Sie ist löslich in Wasser oder Eisessig, unlöslich in Ather, Aceton oder Äthanol. Durch Kochen in konzentrierter HCl und in 0,5 n-NaOH wird sie innerhalb von 30 Minuten zerstört. In 0,5 n-HCl bleibt bei 100° C die Aktivität mindestens 30 Minuten lang unversehrt. Substanz U wird durch Chymotrypsin, proteolytische Fermente aus Schlangengift und durch Hunde- und Menschenserum inaktiviert. Von Trypsin wird sie nicht angegriffen.

II. Eigene Untersuchungen

Wir haben uns bemüht, weitere pharmakologische, chemische und physikalische Kenntnisse über die von W e r l e und E r d ö s beschriebene Substanz Z zu gewinnen. Da die „slow contracting substance“ von G o m e s , trotz auffallender Übereinstimmung in Verhalten und Wirkung, bisher nie unter völlig gleichen Bedingungen zusammen mit Substanz Z untersucht worden ist, haben wir sie stets zum Vergleich herangezogen. Auch wurde versucht, Substanz Z weiter zu reinigen und die gefundenen Möglichkeiten auf S. c. s. auszudehnen.

a) Methoden

1. Darstellung

Substanz Z wurde nach der Originalmethode präpariert.

„Frischer, unter Toluol gesammelter Urin von gesunden Männern wird nach Noble mit Zinkferrocyanid gefällt. Zu je 1000 ccm Urin werden 11,25 ccm einer molaren Kaliumferrocyanidlösung gegeben, dann werden unter kräftigem Rühren 10 ccm molare Zinksulfatlösung zugetropft. Nach einigem Stehen wird vom entstandenen Zinkferrocyanid-Niederschlag abzentrifugiert. Das Überstehende wird verworfen. Der Niederschlag wird zweimal mit je 250 ccm alkoholischer Ammoniaklösung (80% iger Alkohol + 1% NH_3) auf der Zentrifuge eluiert. Beim Stehen über Nacht bei 0° fallen aus den vereinigten NH_3 -Eluaten unwirksame Ballaststoffe aus, die abfiltriert und verworfen werden. Das Eluat wird anschließend im Vakuum zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in einer kleinen Menge destillierten Wassers gelöst und dann mit der 10fachen Menge 96% iger Alkohol versetzt. Der entstehende Niederschlag wird abzentrifugiert und verworfen. Nach dem Verdampfen des Alkohols im Vakuum wird die verbleibende Lösung mit 10% iger Bleiacetatlösung bis zur vollständigen Fällung versetzt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und verworfen, aus dem Überstehenden wird das Blei mit 0,5 n- H_2SO_4 entfernt, dann wird neutralisiert. Die so erhaltene Lösung wird mit der gleichen Menge 2 n-NaOH versetzt und nach 1stündigem Stehen bei Zimmertemperatur 6 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert. Dann wird das noch alkalische Innendialysat (pH über 10) neutralisiert und soweit eingeeengt, daß die 5 Liter Urin entsprechende Extraktmenge sich in etwa 10 ccm wässriger Lösung befindet. Jetzt wird die Substanz Z am besten bei 70° mit Natriumtetraphenylborat („Kalignost“-Heyl u. Co.) ausgefällt

und der Niederschlag auf der Zentrifuge mehrmals mit kaltem Aceton gewaschen. Der Rückstand wird in 96%igem Methanol aufgenommen, vom Unlöslichen wird abzentrifugiert. Nach dem Vertreiben des Alkohols im Vakuum wird die Substanz Z wieder in Wasser gelöst, und zwar so, daß 1 ccm der Lösung 1 l Urin entspricht.“

Später sind wir dazu übergegangen, die Kalignostfällung zu modifizieren. Nach der Dialyse (Stufe 8 bei Werle und Erdös) wird neutralisiert und im Vakuum soweit eingengt, daß pro Liter Urin etwa 4 ml Flüssigkeit verbleiben. Diese Lösung wird mit der entsprechenden Menge 2 n-NaOH etwa auf p_{H} 13 gebracht. Der entstehende gelbbraune Niederschlag wird abzentrifugiert und verworfen. Das Überstehende wird bei Zimmertemperatur tropfenweise mit konzentrierter Kalignostlösung bis zur vollständigen Fällung versetzt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und in üblicher Weise mehrmals mit kaltem Aceton gewaschen, in 96%igem Methanol aufgenommen und nach dem Vertreiben des Alkohols im Vakuum entweder mit Aceton getrocknet oder in 1 ml Wasser pro Liter Urin gelöst. Wir bezeichnen das so erhaltene Präparat als Substanz Z'.

S. c. s. wurde nach der von Gomes angegebenen Methode B (Butanolextrakt, crude powder von Walaszek) gewonnen. Urin wird mittels HCl auf p_{H} 5 gebracht, mit NaCl gesättigt und durch Schütteln mit der gleichen Menge n-Butanol extrahiert. Die Butanolphase wird durch Zentrifugieren abgetrennt und mit dem fünffachen Volumen Äther versetzt. Es fällt pro Liter Urin etwa ein Gramm eines rötlich-weißen Pulvers aus, das im Vakuum getrocknet wird.

Zu vergleichenden Untersuchungen haben wir dieses Rohpräparat ebenfalls einer Kalignostfällung im alkalischen Milieu unterzogen. Die einem Liter Urin entsprechende Menge wurde in 8 ml Wasser aufgenommen, zur besseren Lösung kurz auf etwa 70° erwärmt und $1\frac{1}{2}$ Stunde stehen gelassen. Dann wurde vom Unlöslichen abzentrifugiert; es ergab sich ein rotbrauner Niederschlag, der verworfen wurde. Das Überstehende wurde nunmehr mit 2 n-NaOH auf p_{H} 13 gebracht, durch Zentrifugieren vom entstandenen Niederschlag befreit und bis zur vollständigen Fällung mit konzentrierter Kalignostlösung versetzt. Die weitere Behandlung (Waschen mit Aceton, Aufnehmen in Methanol usw.) erfolgte wie bei Substanz Z beschrieben.

2. Biologischer Nachweis

Substanz Z und S. c. s. wurden am isolierten, nicht graviden Rattenuterus oder am isolierten atropinisierten Meerschweinchendarm getestet. Die Organe waren in luftdurchperlter Tyrodelösung bei 37° suspendiert. Das Badvolumen betrug 10 ml, Hebelübertragung 1:5.

3. Papierchromatographie

Wir arbeiteten mit der aufsteigenden Methode bei Zimmertemperatur. Als Papier verwendeten wir Nr. 2043 b von Schleicher und Schüll. Als Lösungsmittel dienten die organische und die wässrige Phase von in 0,01 n-HCl gesättigtem Phenol (50 g Phenol pro 100 ml 0,01 n-HCl), die organische Phase eines n-Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisches (4:1:5) und die von Walaszek angegebene Mischung von Aceton-n-Butanol-HCl (10:4:2).

Die aktive Substanz wurde durch Eluieren und Austesten am Rattenuterus nachgewiesen.

Wir haben uns auch um eine Färbung der zu untersuchenden Substanzen auf dem Filterpapier bemüht. Wie sich später herausgestellt hat, ließ sich das aktive Prinzip selber in den von uns verwendeten Größenordnungen nicht anfärben. Jedoch ergaben sich durch die Anfärbung von Begleitstoffen Hinweise auf die Lage der aktiven Substanz, die für die Chromatographie von Wichtigkeit sein können. Wir wollen deshalb unsere Färberversuche hier mitteilen:

Ninhydrin hat sich uns nicht bewährt. Amidoschwarz gibt zwar eindeutige, aber wenig eindrucksvolle Flecke. Eine kräftige Färbung dagegen ließ sich durch Benzidinanfärbung nach vorausgehender Chlorierung [27] erzielen:

Der zu färbende Papierstreifen wird kurz in 96 %iges Methanol getaucht und sofort mittels Filterpapiers von der überschüssigen Flüssigkeit befreit. (Das in der Originalvorschrift anstelle von Methanol angegebene angesäuerte Alkohol-Acetongemisch läßt sich für unsere Zwecke nicht verwenden, da die färbbare Substanz von ihm nicht benetzt wird.) Das Papier wird dann für 2 Minuten in eine aus Salzsäure und Kaliumchlorat entwickelte, deutlich gelbe Chloratmosphäre gebracht und anschließend im Luftstrom getrocknet. Es kommt dann bis zur maximalen Anfärbung in mit Benzidin (ca. 1 %) gesättigte 10 %ige Essigsäure. Zum Abschluß wird das Benzidin durch 3maliges Baden in Äthanol entfernt. Es ergibt sich eine schön abgegrenzte hell- bis dunkelblaue Anfärbung. Da die Farbe nicht haltbar ist, müssen die Flecke markiert werden.

Als störend haben sich Phenol und der bei Elektrophoreseversuchen verwendete Veronal-Puffer erwiesen. Phenol wird vor der Färbung durch absoluten Alkohol, Veronal (z. T. als Veronal-Na vorliegend!) durch mit einigen Tropfen rauchender HCl angesäuertes Aceton entfernt.

b) Ergebnisse

1. Reinigung

Versuche, Substanz Z durch fraktionierte Ausfällung mit Äther aus verschiedenen Lösungsmitteln (Methonal, Eisessig, Eisessig-Pyridin) weiter anzureichern, schlugen fehl. Auch mit S. c. s. wurden auf diesem Wege keine konstanten Erfolge erzielt. Zwar gelang uns einmal eine mäßige Anreicherung, jedoch ließ sich dieses Ergebnis nicht reproduzieren.

Einen guten Reinigungseffekt bei im Endergebnis nicht oder kaum verminderter Aktivität sahen wir, wenn die Kalignostfällung der Substanz Z im alkalischen Milieu vollzogen wurde. Zwar war das Ergebnis, gemessen an dem Gewichtsverhältnis der als Endprodukte erhaltenen Trockensubstanzen, nicht sehr deutlich (Tabelle 5), doch zeigte bereits die Betrachtung der wässrigen Lösung, daß ein bisher vorhandener gelber Farbstoff weitgehend eliminiert worden war. Noch eindrucksvoller war die Beobachtung, daß sich Substanz Z' im Gegensatz zu der nach der ursprünglichen Methode dargestellten Substanz Z nach der Chlor-Benzidinmethode nur noch ganz schwach anfärben ließ. Dieses Ergebnis zeigt, daß es gelungen ist, vor allem organische Begleitsubstanzen zu entfernen.

Wie erwähnt, wurde auch das Rohpräparat der S. c. s. einer Kalignostfällung in alkalischem Milieu unterzogen. (Vorversuche hatten ergeben, daß genau am Neutralpunkt der für dieses Präparat charakteristische, pharmakologisch inaktive, rotbraune Farbstoff durch Kalignost gefällt wird, während er im alkalischen Bereich im Überstehenden bleibt. In saurer Lösung fällt Kalignost noch eine erhebliche Menge weiterer unerwünschter Begleitstoffe zusammen mit dem wirksamen Prinzip aus.) Das Endprodukt der im Alkalischen durchgeführten Fällung war, abgesehen von einem etwas größeren Trockengewicht, äußerlich von Substanz Z' nicht zu unterscheiden. Die Färbbarkeit mit Chlor-Benzidin war bei beiden Präparaten in gleicher Weise vermindert. Ein Aktivitätsverlust war gegenüber der Ausgangssubstanz nicht eingetreten. Im Gegenteil: die reinere Form zeigte sogar deutlich höhere Aktivität, vermutlich durch den Wegfall störender Begleitstoffe. Hier bewies auch das Verhältnis der Trockengewichte einen hohen Reinigungseffekt. In dem in Tabelle 5 aufgeführten Versuch ergab sich eine Anreicherung auf das 43fache.

Tabelle 5:

Reinigungseffekt der Kalignostfällung im Alkalischen.

Substanz	Art der Darstellung	Gewicht des Acetontrockenpulvers/l. Urin	Farbe der wässrigen Endlösung	Anfärbbarkeit mit Chlor-Benzidin
Z	nach Werle und Erdös	22 mg	gelb	+++
Z'	Kalignostfällung im Alkalischen	18 mg	blaßgelblich, kaum gefärbt	(+)
S. c. s.	Butanolextrakt (crude powder)	1225 mg	tief rotbraun	++++
S. c. s.	Kalignostfällung im Alkalischen	28 mg	wie Z'	(+)

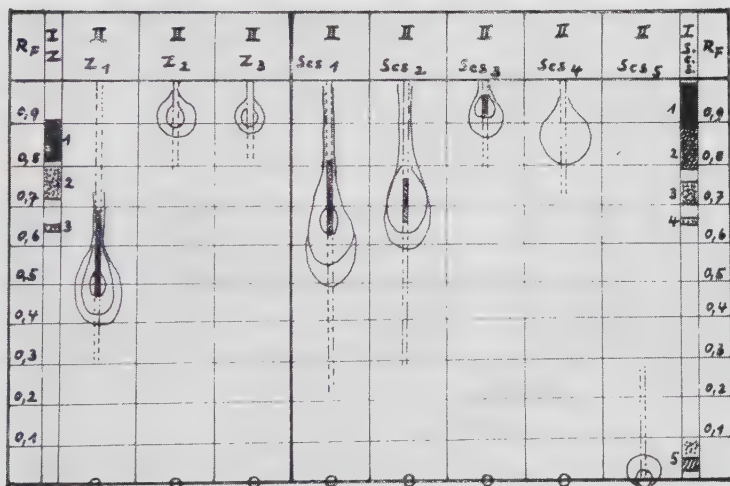
2. Papierchromatographie

Wurden Substanz Z oder Rohsubstanz von S. c. s. mit der organischen Phase einer mit 0,01 n-HCl gesättigten Phenollösung chromatographiert und mit Chlor-Benzidin behandelt, so zeigte sich eine deutliche Anfärbung im Bereich von R_F 0,9. Dieser Wert entspricht dem von G o m e s im biologischen Test für S. c. s. ermittelten R_F -Wert. Wir konnten in diesem Versuch keine Aktivität feststellen, vermutlich infolge zu geringer Empfindlichkeit unseres Uterus-Präparates.

Verwendeten wir dagegen die wässrige Phase desselben Lösungsmittels, so erhielten wir die Aktivität in brauchbarer Ausbeute zurück. Färbung mit Chlor-Benzidin und Auswertung am Rattenuterus führten zu folgenden Feststellungen: Bei Substanz Z fand sich ein im wesentlichen einheitlicher Fleck bei R_F 0,8. Hier war auch die biologische Aktivität zu finden. Schwächer anfärbbare und schmalere Zonen im Bereich von R_F 0,7 und 0,6 ließen im Test keine Aktivität erkennen. Bei S. c. s., in Form der Rohsubstanz chromatographiert, lag die am intensivsten gefärbte Zone bei R_F 0,9. Ein weniger starker Fleck fand sich bei R_F 0,8. Auch hier stimmten Anfärbung und biologische Aktivität miteinander überein. Bei S. c. s. trat außerdem regelmäßig eine anfärbbare Fraktion mit dem R_F -Wert 0,0 in Erscheinung, die eine pharmakologische Aktivität vermissen ließ.

Um Klarheit zu gewinnen, inwieweit die Abweichungen der R_F -Werte bei den beiden Substanzen vielleicht durch störende Begleitstoffe verursacht sind, haben wir Substanz Z und S. c. s. auf je einem Bogen Papier in breitem Streifen aufgetragen und mit der obigen wässrigen Phenollösung chromatographiert. Dann wurde durch Stichproben die Lage der anfärbbaren Substanzen festgestellt (senkrechte Streifen, Nr. I in Abb. 1) und das Papier in entsprechende waagerechte

Abb. 1:



Substanz Z und S. c. s. zweimal in wässrigem Phenol chromatographiert (Skizze). Einzelheiten s. im Text!

Streifen geschnitten, die einzeln eluiert wurden. Wir chromatographierten die Eluate (Nr. 1, 2, 3, 4, 5 in Abb. 1) ein zweites Mal mit dem gleichen Lösungsmittel und färbten aus der Mitte der erkennbaren Flecke herausgeschnittene schmale Streifen wiederum an. Wie die Skizze zeigt, haben sich die R_F -Werte erheblich verändert. Die Hauptfraktion der Substanz Z liegt nun bei R_F 0,5, die von S. c. s. bei R_F 0,6 und 0,7. Dagegen zeigen die ursprünglich langsamer laufenden Substanzen (ohne biologische Aktivität) jetzt höhere R_F -Werte. Nur die Fraktion mit dem ursprünglichen R_F -Wert 0,0 behielt auch bei der zweiten Chromatographie ihren Standort bei. Leider gelang eine biologische Auswertung nicht. Immerhin zeigt der Versuch, daß sich wenigstens die färberisch erfaßbaren Fraktionen der beiden Präparate sehr ähnlich verhalten. Er läßt weiterhin erkennen, daß S. c. s. eine

Substanz enthält, die in wässriger Phenollösung nicht wandert und in der Präparationsstufe von Substanz Z nicht mehr enthalten ist. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob diese Substanz in Beziehung steht mit W a l a s z e k s Fraktion Z₂.

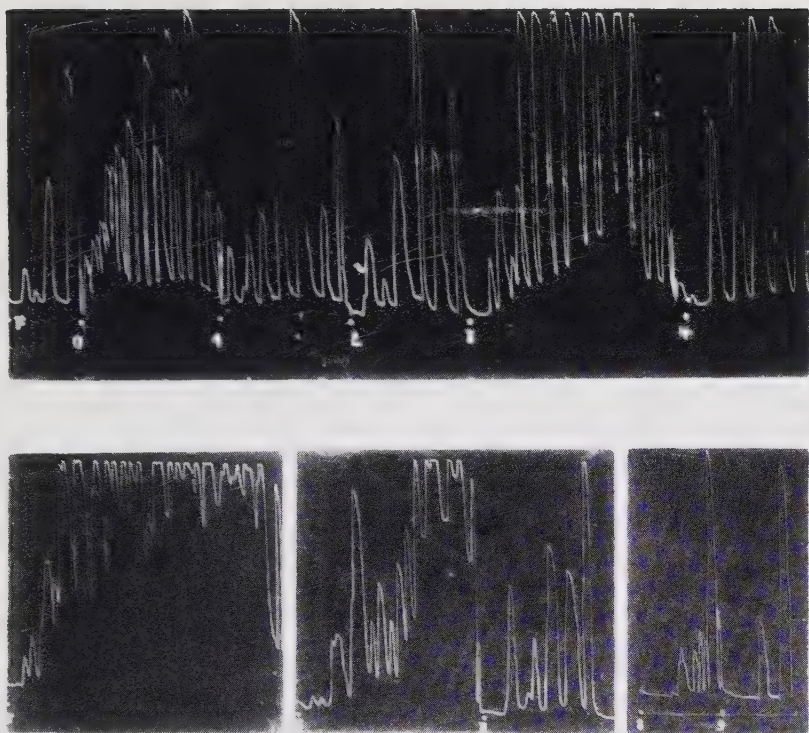
Wurden die Substanzen in Butanol-Eisessig-Wasser chromatographiert, so zeigte sich für Substanz Z eine Anfärbung bei R_F 0,1 bis 0,2, für S. c. s. bei R_F 0,1. Die Elution von Substanz Z ergab eine ange deutete Aktivität im Bereich von R_F 0,1 bis 0,2. Dies stimmt genügend mit den Befunden von G o m e s und von W a l a s z e k überein, die für S. c. s. in diesem Lösungsmittel einen R_F-Wert von 0,2 feststellten.

Wir haben schließlich Substanz Z' mit einem Aceton-n-Butanol-HCl-Gemisch chromatographiert und dabei folgende Beobachtungen gemacht: Bei R_F 0,68 (R_F 0,60 in einem nicht ausgewerteten Vergleichspräparat mit Kalignost gefällter S. c. s.) fand sich ein schmaler, intensiv gelblicher Streifen, der als einzige Stelle des Chromatogramms Polypeptidfärbung gab. Unmittelbar darüber lag eine sehr schmale rötliche Zone, die sich mit Chlor-Benzidin nicht färben ließ. Es war zu sehen, daß sich hier ein großer Teil der in der aufgetragenen Lösung befindlichen Substanzen isoliert und scharf abgegrenzt angesammelt hatte. Die gelbe und rote Zone wurden gesondert ausgeschnitten und am Uterus getestet: Es fand sich keinerlei Aktivität (F in Abb. 2). Der übrige Bogen wurde entsprechend den R_F-Werten 0,0 bis 0,9 in 10 Streifen geschnitten, die ebenfalls eluiert wurden.

Die Testung am Rattenuterus (Abb. 2) ergab eine geringe Aktivität bei R_F 0,0, eine mäßige Aktivität bei R_F 0,3 und ganz erhebliche Aktivität bei R_F 0,5 und 0,6. Mit diesen Ergebnissen befinden wir uns in ziemlicher Übereinstimmung mit den Befunden W a l a s z e k s, der für seine gereinigte Substanz Z₁ unter gleichen Bedingungen eine verhältnismäßig diffuse Aktivitätszone um R_F 0,6 und für Z₂ eine umschriebene Zone vom R_F-Wert 0,0 feststellte. W a l a s z e k hat im Text nicht ausdrücklich erwähnt, aber in der Legende zu Fig. 3 angedeutet, daß für Z₁ ein gesonderter Gipfel mit geringerer Aktivität im Bereich von R_F 0,2 gefunden wurde. Auf der Abbildung selber läßt er sich nicht erkennen. Die Ähnlichkeit zwischen seinen und unseren Ergebnissen wäre bei einem dritten Aktivitätsgipfel noch größer.

Auffallend ist die Übereinstimmung unserer Befunde an Substanz Z' mit den Ergebnissen W a l a s z e k s bei der Chromatographie von Bradykinin. Freilich kann eine solche Ähnlichkeit auch rein zufällig sein.

Abb. 2:



Biologische Auswertung eines Papierchromatogramms von Substanz Z' in Aceton-n-Butanol-HCl. (Aufsteigende Chromatographie, 8 Stunden gelaufen). Das Chromatogramm wurde entsprechend den R_F -Werten in Streifen geschnitten, die eluiert wurden. Ein gelblicher, mit Chlor-Benzidin anfärbarer Streifen wurde gesondert ausgeschnitten und eluiert (s. Text!). Isolierter Rattenuterus in 10 ml Tyrodelösung bei 37°. Bei F Eluat der anfärbaren Substanz, 0 entspricht $R_F = 0,0$; 1 entspricht $R_F = 0,1$ usw. Bei 6—9 wurde nur die Hälfte des Eluates gegeben.

Infolge einer apparativen Störung ist bei einzelnen Kurven der Schreibhebel oben angestoßen. Die vorhandene Aktivität läßt sich trotzdem eindeutig erkennen.

3. Pharmakologische Beobachtungen an Substanz Z und Vergleich mit S. c. s.

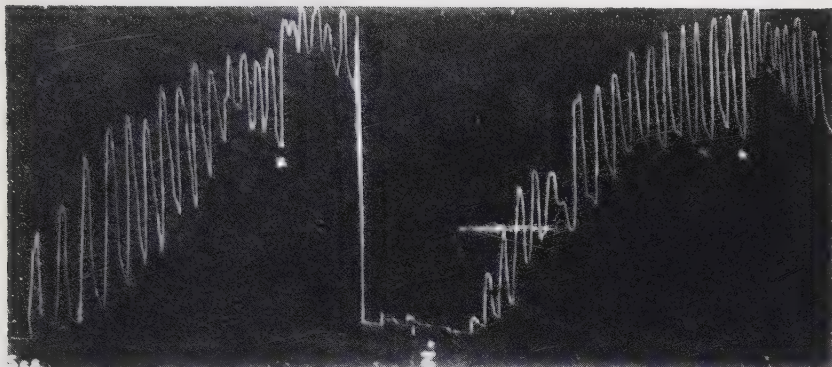
Wir haben Substanz Z und S. c. s. unter gleichen Bedingungen am Rattenuterus und am Meerschweinchendarm getestet und volle pharmakologische Übereinstimmung gefunden. Beide Substanzen führen zu anhaltenden Kontraktionen, die nach deutlicher Latenz einsetzen und bedeutend langsamer, als Oxytocin, 5-Oxytryptamin (oder Histamin am Darm) ihren Höhepunkt erreichen. Beide sind schwer auswaschbar. Auch scheint das einmal gefundene Aktivitätsverhältnis (ungefähr 1 bezogen auf die entsprechende Urinmenge) zwischen Präparaten beider Substanzen von Organ zu Organ, d. h. ungeachtet der organspezifischen und individuellen Ansprechbarkeitsunterschiede konstant zu bleiben, während z. B. das Aktivitätsverhältnis gegenüber Oxytocin erheblich wechselt. Abbildung 3a und b zeigt zwei entsprechende extreme Fälle.

Wir haben weiter beobachtet, daß sich die Kurventypen mit zunehmender Reinheit der Substanzen ändern. Dies gilt wieder für Substanz Z und S. c. s. in gleicher Weise. Den Rattenuterus, an dem uns dieses Verhalten auffiel, regen die in der üblichen Weise hergestellten Präparate nach einer gewissen Latenzzeit zu einem Kontraktionsverlauf an, bei dem, wenn auch langsam, so doch schließlich in ziemlich steilem Anstieg ein Maximum erreicht wird. Dagegen sahen wir, wenn die Substanz durch Elution aus einem Papierchromatogramm gewonnen worden war, eine andere Verlaufsweise: Substanz Z wie S. c. s. führen dann zu einem besonders protrahierten, gleichmäßigen Anstieg der Erregung, die erst nach sehr langer Zeit den Höhepunkt erreicht. Abbildung 2 und 3b veranschaulichen diesen Reaktionstyp.

Abb. 3a:



Abb. 3b:



Vergleich von Substanz Z und S. c. s. verschiedener Reinheitsgrade am Rattenuterus: Der Kurventyp der beiden Substanzen ist jeweils der gleiche.

a) isolierter Rattenuterus in Tyrodelösung bei 37° suspendiert.

Bei 1 Substanz Z entsprechend 15 ml Urin,

bei 2 Substanz Z' entsprechend 15 ml Urin,

bei 3 Substanz Z' entsprechend 18 ml Urin,

bei 4 S. c. s. (mit Kalignost gefällt) entsprechend 15 ml Urin,

bei 5 S. c. s. (mit Kalignost gefällt) entsprechend 18 ml Urin,

bei 6 S. c. s. Rohsubstanz entsprechend 15 ml Urin.

b) Vorbemerkung wie bei a. Eluate der aktiven Substanz von Papierchromatogrammen in wässriger Phenollösung. Bei x Spülen.

Eine Ausnahme macht vielleicht die in Aceton-Butanol-HCl mit $R_f = 0$ am Ausgangspunkt liegegebliebene Fraktion, die wahrscheinlich W a l a - s z e k s Z_2 entspricht. Hier beginnt der Anstieg praktisch ohne Latenzzeit und erreicht rascher den Scheitelpunkt. Allerdings kann die eine Kurve, die wir von dieser Fraktion besitzen, keinen endgültigen Aufschluß geben.

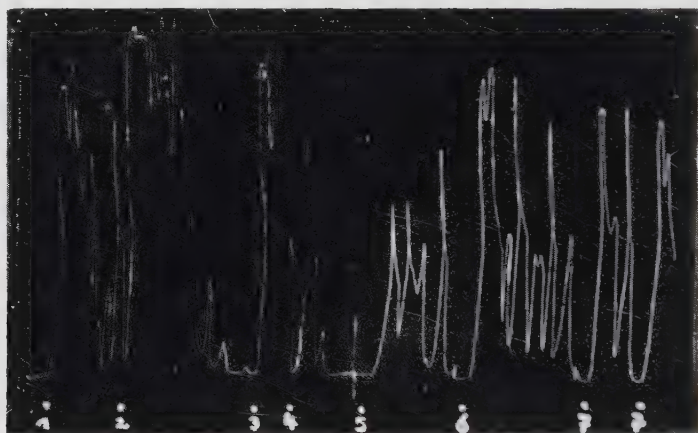
Wir haben eine Zeit lang ein abweichendes Verhalten von Substanz Z wie auch von S. c. s. beobachtet. Damals sprach der Rattenuterus auf Präparate beider Substanzen sehr schwach an. Jedoch trat nach einmaligem Spülen noch eine beachtliche Kontraktion auf, obwohl der Hauptteil der Substanz ausgewaschen sein mußte. Da beide Präparate das gleiche Verhalten zeigten, muß es sich um eine Besonderheit des uns zur Verfügung stehenden Urins gehandelt haben. Wir denken an einen Hemmstoff, der leichter auswaschbar ist, als das aktive Prinzip. Selbst in durch Papierchromatographie gereinigten Substanzen war dieser Effekt noch angedeutet vorhanden. Abbildung 3b gibt ein Beispiel.

Eine Verbesserung der Aktivität ließ sich — wiederum bei Substanz Z wie bei S. c. s. — erreichen, wenn durch die mit HCl auf pH 1 gebrachten Lösungen der Substanzen 45 Minuten lang ein Sauerstoffstrom geleitet wurde. In nicht hemmstoffhaltigen Präparaten führte Sauerstoffdurchströmung dagegen eher zu einer Aktivitätsminderung.

Werden bei Versuchen am Rattenuterus Substanz Z oder S. c. s. gleichzeitig mit unterschwelligen Dosen von 5-Oxytryptamin gegeben (Abbildung 4), so zeigt sich zu Beginn der Kontraktion ein kurzdauernder Anstieg, der offenbar einer Aktivierung der 5-Oxytryptaminwir-

kung entspricht und über einen rein additiven Effekt hinausgeht. Dieses Verhalten fand sich regelmäßig und in bemerkenswerter Gleichartigkeit bei beiden Polypeptiden. Es war bisher nicht möglich, weitere Einzelheiten dieses Phänomens zu untersuchen. Substanz Z und S. c. s. sind, wie erwähnt, schwer auswaschbar. Auch nach mehrmaligem Spülen bleibt eine lang anhaltende Erregbarkeitssteigerung gegenüber 5-Oxytryptamin bestehen, die die ursprünglichen Verhältnisse verschleiert.

Abb. 4:



Aktivierung von 5-Oxytryptamin in unterschwelligen Dosen durch Substanz Z. Rattenuterus bei 37° in Tyrodelösung suspendiert.

Bei 1 $0,6 \times 10^{-3}$ V. E. Oxytocin

bei 2 $0,5 \gamma$ 5-Oxytryptamin

bei 3 $0,05 \gamma$ 5-Oxytryptamin

bei 4 $0,01 \gamma$ 5-Oxytryptamin

bei 5 Substanz Z entsprechend 2 ml Urin

bei 6 Substanz Z entsprechend 2 ml Urin + $0,01 \gamma$ 5-Oxytryptamin

bei 7 $0,01 \gamma$ 5-Oxytryptamin

III. Diskussion

Die Vergleiche zwischen Substanz Z und S. c. s. haben ergeben, daß sich beide Substanzen in pharmakologischer und chemischer Hinsicht vollständig gleich verhalten. Auch im Papierchromatogramm hat sich bei 4 verschiedenen Lösungsmitteln keine grundsätzliche Differenz ergeben. Lediglich die Tatsache, daß S. c. s. im Rohzustand eine mit Polypeptidfärbung darstellbare Fraktion besitzt, die sich bei Substanz Z nicht nachweisen läßt, kann als echter Unterschied gewertet werden. Beide Substanzen entstammen dem gleichen Ausgangsmaterial.

Auf Grund dieser Tatsachen kann nunmehr mit genügender Sicherheit behauptet werden, daß Substanz Z und S. c. s. in ihren wesentlichen Anteilen identisch sind.

Auch für Substanz Z scheint zu gelten, was Walaszek an seinem Präparat festgestellt hat: Sie ist ein Gemisch von mindestens zwei verschiedenen Polypeptiden. Ob die einzelnen Fraktionen bei Substanz Z und S. c. s. in gleichem Verhältnis und vollständig vertreten sind, entzieht sich vorläufig unserer Kenntnis.

Ebenso wenig läßt sich nach den heutigen Befunden klären, in welcher Beziehung Substanz Z etwa zu den Polypeptiden Kallidin, Bradykinin oder Substanz U steht.

Mit der Annahme einer Identität der Substanz Z und S. c. s. gewinnt die Tatsache an Bedeutung, daß es uns gelungen ist, ein einfaches und rasch zu bewerkstelligendes Reinigungsverfahren zu erarbeiten, das 100%ige Aktivitätsausbeute bringt und sich mehr noch bei der Anwendung auf S. c. s.-Rohpräparat, als bei Substanz Z bewährt. Der Verbindung von G o m e s ' „Methode B“ mit Kalignostfällung im alkalischen Milieu macht es möglich, in wenigen Arbeitsgängen beliebige Mengen eines genügend vorgereinigten Präparates für weitere Anreicherungsversuche zu gewinnen.

Für diese hat Walaszek einen Weg aufgezeigt. Es erscheint aussichtsreich, seine Isolierungsmethoden nunmehr auf eine mehr als 40 mal reinere Ausgangssubstanz anzuwenden. Eine weitere Möglichkeit könnte in der Tatsache begründet liegen, daß sich bei der Papierchromatographie unserer vorgereinigten Substanzen in Aceton-Butanol-HCl ein großer Teil der Verunreinigungen eng umschrieben mit einem höheren R_F-Wert, als die aktive Substanz, anreichert. Die Annahme erscheint berechtigt, daß sich dieses Verfahren in größerem Maßstab in die Säulenchromatographie umsetzen läßt.

Zusammenfassung

Es wird ein Überblick über pharmakologisch aktive Polypeptide gegeben unter besonderer Berücksichtigung von blutdruck-, darm- und uteruswirksamen Substanzen aus Urin.

Ein Polypeptid aus dieser letzteren Gruppe, die von W e r l e und E r d ö s beschriebene Substanz Z, wurde in eigenen Versuchen weiter gereinigt, pharmakologisch ausgetestet und der Papierchromatographie mit verschiedenen Lösungsmitteln unterzogen; ein von G o m e s in menschlichem Urin aufgefundenes Prinzip von gleichartiger Wirkung wurde zu Vergleichsuntersuchungen herangezogen.

Substanz Z von G o m e s ' „slow contracting substance“ können weder pharmakologisch noch physikalisch oder chemisch unterschieden werden; da sie zudem dem gleichen Ausgangsmaterial entstammen,

sind sie mit Sicherheit als in ihren wesentlichen Anteilen identisch anzusehen.

Die für die weitere Reinigung von Substanz Z ausgearbeitete Modifikation läßt sich auch auf die Substanz von G o m e s anwenden, bei der in 100 %iger Ausbeute eine Anreicherung auf das 43fache erzielt wurde.

Literatur:

- [1] van Dyke, H. B., „Neurohypophyseal Hormones“ in Gaddum, J. H., Polypeptides, which stimulate plain muscle, Edinburgh 1955.
- [2] Frey, E. K., H. Kraut und E. Werle, Kallikrein (Padutin), Stuttgart 1950.
- [3] Werle, E., „The chemistry and pharmacology of Kallikrein and Kallidin“ in Gaddum a. a. O.
- [4] Pernow, B., „The distribution and properties of substance P“ in Gaddum a. a. O.
- [5] Vogt, W., „Darmstoff: Occurrence and properties“ in Gaddum a. a. O.
- [6] Roche e Silva, M., „Bradykinin: Occurrence and properties“ in Gaddum a. a. O.
- [7] Schachtner, M., Brit. J. Pharmacol. **11**, 111 (1956).
- [8] Lewis, G. P. and T. Work, J. Physiol. **135**, 1 (1956).
- [9] Prado, J. L., R. Monier, Eline S. Prado and C. Fromageot, Biochem. Biophys. Act. **22**, 87 (1956).
- [10] Armstrong, D., J. B. Jepson, C. A. Keele and J. W. Stewart, J. Physiol. **135**, 350 (1957).
- [11] Beraldo, W. T., „Substance U and related substances from urine“ in Gaddum a. a. O.
- [12] Croxatto, H., „Active Polypeptides formed by Pepsin“ in Gaddum a. a. O.
- [13] Braun-Menendez, E., „Production and inactivation of Hypertensin“ in Gaddum a. a. O.
- [14] Page, J. H., „Angiotonin“ in Gaddum a. a. O.
- [15] Gaddum J. H., a. a. O. S. 131.
- [16] Edlbacher-Leuthardt, Lehrbuch der physiologischen Chemie, 11. Aufl., Berlin 1954.
- [17] van Armann, C. G., „Interrelationships among some peptide precursors“ in Gaddum a. a. O.
- [18] zit. nach Waring, H. and F. W. Landgrebe in „The Hormones“ von G. Pincus und K. V. Thimann, Bd. II, S. 428, New York 1950.
- [19] Werle, E., Ehrlicher, R., Koebke, K., Biochem. Z. **322**, 27 (1951).
- [20] Werle, E. und E. G. Erdös, Arch. exp. Path. u. Pharmacol. **223**, 234 (1954).
- [21] Gomes, F. P., Brit. J. Pharmacol. **10**, 200 (1955).
- [22] Gaddum, J. H., Brit. J. Pharmacol. **8**, 321 (1953).
- [23] Clark, L. C., Winckler, C., Gollan, F. and Fox, R. P., J. biol. Chem. **206**, 717 (1954).
- [24] Walaszek, E. J., Brit. J. Pharmacol. **12**, 223 (1957).
- [25] Pernow, B., Act. physiol. scand. **29**, Suppl. 105 (1953).
- [26] Andrade, S. O., Dinitz, C. R. und Roche e Silva, M., Arch. intern. Pharmacodyn. **95**, 100 (1953).
- [27] zit. nach Turba in Hoppe-Seyler/Thierfelder „Handbuch der physiologischen und pathologisch-chemischen Analyse“, 10. Aufl. Bd. III, 2, S. 1718, Berlin 1955.

Lebenslauf

Am 1. Februar 1920 bin ich als Sohn des Pfarrers Georg Brehmer in Kohlberg (Opf.) geboren. Nach dem Besuch der Volksschule und des Gymnasiums legte ich im März 1938 am Hum. Gymnasium bei St. Anna in Augsburg die Reifeprüfung ab. Von 1940 bis 1947 studierte ich in München und Tübingen Medizin; zeitweise hatte ich damals Wehr- und Kriegsdienst zu leisten. Am 15. Oktober 1947 erhielt ich nach bestandenem Staatsexamen in Tübingen die Approbation als Arzt. In den folgenden Jahren bemühte ich mich um eine allgemeinärztliche, psychiatrisch-neurologische und biochemische Ausbildung. Seit 1. Oktober 1957 arbeite ich als wissenschaftlicher Assistent am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Marburg.

